

SISTEMA NEUREGULINA1/ERBB

Importância no Controlo da Função Cardíaca

Luisa LOPES-CONCEIÇÃO, Marina DIAS-NETO, Ana Patrícia FONTES-SOUSA, Pedro MENDES-FERREIRA, Carolina MAIA-ROCHA, Tiago HENRIQUES-COELHO, Gilles de KEULENAER, Adelino F. LEITE MOREIRA, Carmen BRÁS-SILVA.

RESUMO

A família das neuregulinas (NRG), factores de crescimento semelhantes ao factor de crescimento epidérmico, é conhecida por induzir o crescimento e a diferenciação de células musculares esqueléticas, neuronais, gliais e epiteliais. Esta família engloba quatro membros, destacando-se a NRG1 por ser a mais vastamente estudada, nomeadamente a nível cardiovascular. Os efeitos biológicos da NRG1 são mediados por receptores ErbB do tipo cinase da tirosina. No coração adulto, a NRG1 é expressa pelas células do endotélio endocárdico e do endotélio microvascular cardíaco e os seus receptores ErbB2/ErbB4 são expressos pelos cardiomiócitos ventriculares e estão localizados no sistema dos túbulos T e discos intercalares, em proximidade com os componentes do sistema de acoplamento excitação-contracção.

A importância do sistema NRG/ErbB a nível cardiovascular tornou-se evidente após se ter constatado que pacientes tratados com trastuzumab (anticorpo monoclonal contra o receptor ErbB2 usado no tratamento do cancro da mama) podem desenvolver disfunção ventricular e têm maior risco de cardiomiopatia quando combinado com antraciclinas. Os estudos subsequentes realizados em condições *in vitro* e *in vivo* têm permitido clarificar os efeitos e as respectivas vias de sinalização associados ao sistema NRG1/ErbB no coração adulto. São já conhecidos alguns efeitos cardiovasculares do sistema NRG1/ErbB, nomeadamente a nível vascular (estimulação da angiogénese e efeito ateroprotector) e miocárdico (efeito inotrópico negativo), bem como na sobrevivência, no crescimento celular e na organização dos cardiomiócitos (organização miofibrilar e contacto intercelular). Adicionalmente, a interacção deste sistema com outros mediadores neuro-humorais tem sido estudada. Neste sentido, destaca-se o papel na modulação fisiológica do equilíbrio simpático-vagal e a interacção com o sistema de sinalização da endotelina-1. Os efeitos descritos resultam da activação de diferentes cascatas de sinalização intracelular, como consequência da ligação da NRG1 aos receptores ErbB. Algumas vias de sinalização cardíaca identificadas até ao momento incluem as moléculas MEK/Erk 1/2, fosfatidilinositol 3-cinase/Akt, a cinase de adesão focal, a família Gab (ligante associado a Grb-2), o factor de crescimento endotelial vascular e a produção de NO através da síntese do óxido nítrico endotelial.

Neste contexto, o objectivo deste trabalho foi compilar a informação existente sobre o sistema NRG1/ErbB, com particular incidência nos seus efeitos cardiovasculares.

L.L-C, M.D-N, C.B-S, A.P.F-S, P.M-F, C.M-R, T.H-C., A.F.L-M.: Serviço de Fisiologia. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Porto. Portugal.
C.B-S: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto. Porto. Portugal.
A.P.F-S.: Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia / UMIB, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS). Universidade do Porto. Porto. Portugal
G.K.: Laboratory of Physiology. University of Antwerp. Antwerp. Belgium.

SUMMARY

NEUREGULIN1/ErbB SYSTEM

Importance in the control of cardiovascular function

The family of Neuregulins (NRG), growth factors like epidermal growth factor, is known to induce growth and differentiation of epithelial, glial, neuronal, and skeletal muscle cells. This family comprises four members, being NRG1 the most largely studied, particularly at the cardiovascular level. The biological effects of NRG1 in the adult heart are mediated by the tyrosine kinase receptors ErbB. In the adult heart, NRG1 is expressed by cells

of the endocardial endothelium and the cardiac microvascular endothelium, and the receptors ErbB2/ErbB4 are expressed by ventricular cardiomyocytes and are located in T-tubule system and intercalated disks in close proximity to the system components of excitation-contraction coupling.

The importance of the NRG/ErbB signaling axis at the cardiovascular level became evident after discovering that patients treated with trastuzumab (inhibitory antibody against ErbB2, used in the treatment of breast cancer) can develop ventricular dysfunction and have higher risk of cardiomyopathy when co-administered with anthracyclines. Subsequent studies *in vitro* and *in vivo* have clarified the effects and the respective signaling pathways associated with the NRG/ErbB system in the adult heart. Some cardiovascular functions of the NRG1/ErbB system have been described at the vascular (stimulation of angiogenesis and ateroprotector effect) and myocardium level (negative inotropic effect) as well as effect on the survival, cell growth and organization of the cardiomyocytes (myofibrillar organization and cell-to-cell contact between cardiomyocytes). Furthermore, the interaction of this system with other neurohumoral mediators has been studied. Thus, there seems to be a physiological role in modulating the sympathovagal balance and an interaction with endothelin-1 signaling. All these effects result from the activation of different intracellular signaling cascades, as a consequence of the binding of NRG1 to ErbB receptors. Some cardiac signaling pathways identified until now include molecules such as MEK / Erk 1/2, phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt, focal adhesion kinase, Gab (Grb-2-associated binder) family, vascular endothelial growth factor and NO production by endothelial nitric oxide synthase.

Thus, the aim of this paper was to make an up-to-date review of existing information on NRG1/ErbB signaling axis, with particular focus on its cardiovascular effects.

INTRODUÇÃO

As neuregulinas (NRGs) englobam uma grande família de moléculas sinalizadoras, semelhantes ao factor de crescimento epidérmico (EGF – *Epidermal Growth Factor*), estando envolvidas na comunicação intercelular durante o desenvolvimento e o estado adulto. As NRGs foram identificadas originalmente durante a avaliação do ligando para o oncogene neu (também designado por HER2 e ErbB2) e são primariamente expressas em diversos tecidos, nomeadamente no sistema nervoso, no coração, na glândula mamária, no intestino e nos rins. A activação desta via de sinalização nas células-alvo ocorre por interacção com receptores transmembranares da família ErbB do tipo cinase da tirosina. A família das NRGs é constituída por quatro membros, NRG1, NRG2, NRG3 e NRG4, sendo que as funções biológicas das últimas três são pouco conhecidas, contrariamente ao que sucede com a NRG1. A NRG1 é responsável pela proliferação, diferenciação e sobrevivência de muitos tipos de tecidos tais como as células epiteliais mamárias, as células gliais, os neurónios e os miócitos^{1,2}.

A importância da via de sinalização NRG/ErbB e o papel cardioprotector da NRG1 no coração adulto tornaram-se evidentes após se ter constatado que os pacientes com cancro da mama tratados com trastuzumab (Herceptin®), anticorpo monoclonal contra o receptor ErbB2, podem desenvolver disfunção ventricular e apresentam um

risco aumentado de desenvolver cardiomiopatia quando combinado com antraciclina³. O efeito cardioprotector da NRG1 foi posteriormente corroborado experimentalmente ao constatar-se que ratinhos deficientes em NRG1 ou ErbB2 desenvolvem cardiomiopatia dilatada^{4,6}.

ASPECTOS MOLECULARES DO SISTEMA NEUREGULINAS E ErbB

Síntese e secreção de Neuregulinas

O gene da NRG1 tem uma estrutura complexa que codifica pelo menos 15 isoformas diferentes⁷. Estas isoformas foram inicialmente isoladas de diversos tecidos, daí que tenham recebido ao longo do tempo múltiplas designações que reflectem a sua função nos tecidos em que foram encontradas (GGF de *glial growth factor*, ARIA de *acetylcholine-receptor-inducing activity*, heregulina derivado de *regulador do receptor HER2* e DNF de *neu differentiation factor*). Todas as isoformas têm um domínio semelhante ao EGF, cuja estrutura contém três curvas com seis resíduos de cisteína que formam três ligações dissulfeto. Este domínio é simultaneamente necessário e suficiente para activar os receptores⁸ e a ocorrência de *splicing* alternativo no seu terminal carboxilo condiciona a formação de variantes a e b de NRG1, sendo a última dez a cem vezes mais activa do que a primeira⁹. Acresce ainda dizer que os produtos do gene da NRG1 podem ser subdivididos nos tipos I, II e III, o que dificulta a

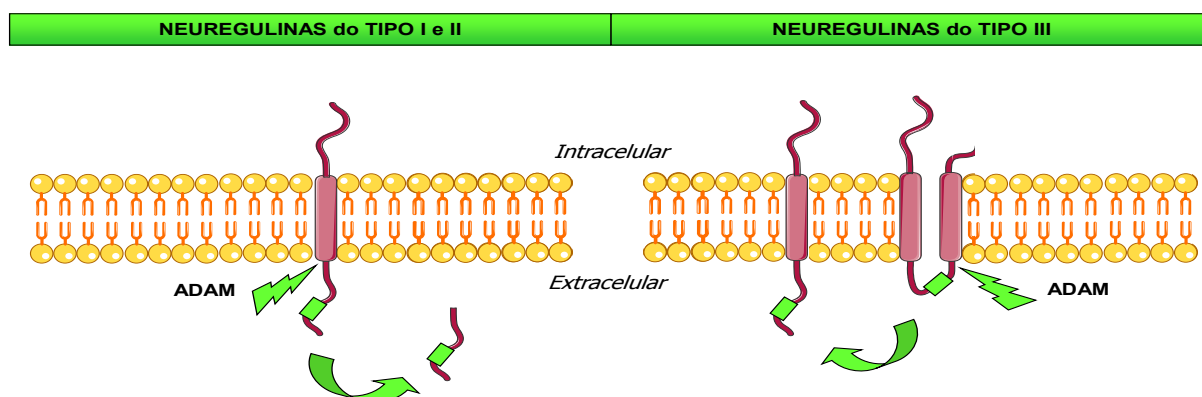


Fig. 1 – Processamento proteolítico das isoformas de NRG1. Legenda: ADAM – desintegrina e metaloproteinase A (adaptado de⁶⁸).

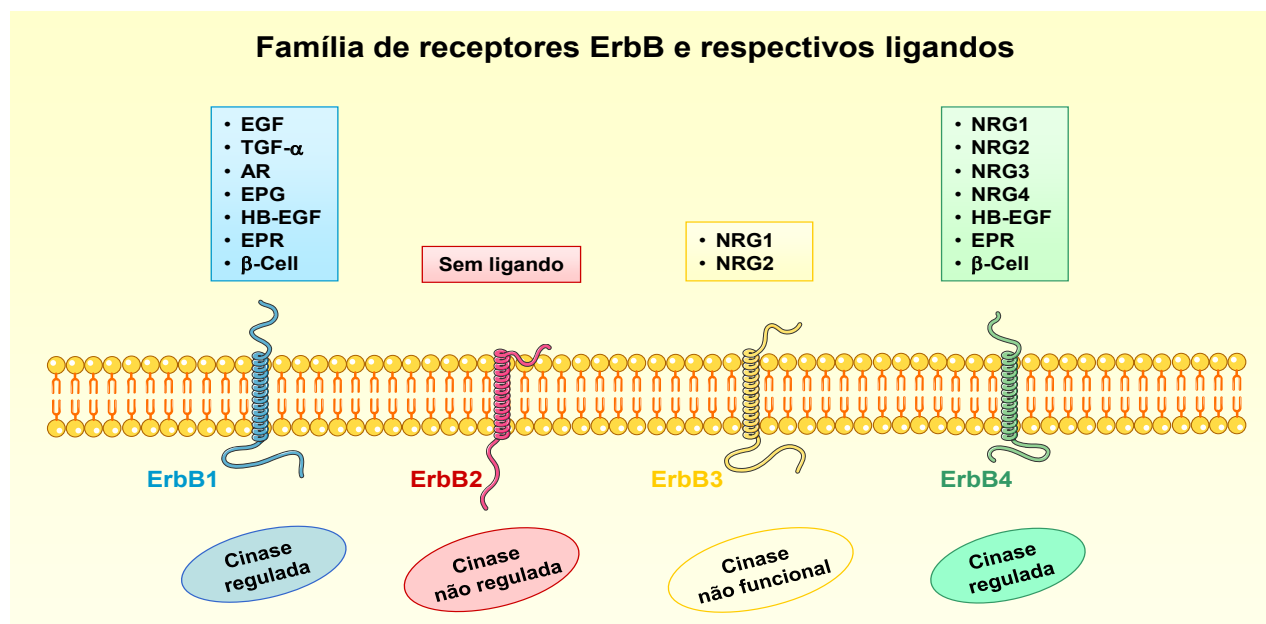


Fig. 2 – Família de receptores ErbB e os seus respectivos ligandos directos. Legenda: AR – anfiregulina; β-Cell – betacelulina; EPR – epiregulina; EPG – epigene; HB-EGF – ligando semelhante ao factor de crescimento epidérmico da heparina; NRG – neuregulina; TGFα – factor de crescimento transformador α (adaptado de¹⁶).

compreensão da sua biologia^{1,9}. As NRG1 do tipo I são as isoformas que predominam no coração, não sendo, no entanto, exclusivas. As NRG1 do tipo I e II diferem das do tipo III por conterem um domínio semelhante à imunoglobulina e por serem proteínas transmembranares que atravessam a membrana citoplasmática num só local, enquanto as neuregulinas do tipo III contêm um domínio rico em cisteína e são proteínas transmembranares que atravessam a membrana em dois locais distintos.

A clivagem proteolítica destas proteínas por membros da família *desintegrina e metaloproteinase A* (ADAM - *A Disintegrin And Metalloproteinase*), nomeadamente ADAM17 (enzima conversora do factor de necrose tumoral α) e ADAM19 (meltrina-β)^{10,11}, resulta na libertação de fragmentos bioativos (NRGs tipo I e II) ou na formação

de um fragmento transmembranar do terminal N (NRGs tipo III)¹² (Figura 1). A libertação proteolítica do domínio extracelular é um processo necessário para activar os receptores ErbB. Assim, o processamento proteolítico das isoformas de NRG de ligação à membrana, controlado pelo seu domínio intracelular, é um passo crucial na via de sinalização NRG1/ErbB¹³.

Receptores ErbB

A família de receptores ErbB é estruturalmente semelhante à dos receptores dos EGFs. Inclui quatro subtipos de receptores do tipo cinase da tirosina, ErbB1, ErbB2, ErbB3 e ErbB4, que têm um papel crítico no controlo de processos fisiológicos como diferenciação, crescimento e sobrevivência. Por este motivo, a ampliação,

Mecanismos de activação dos receptores ErbB

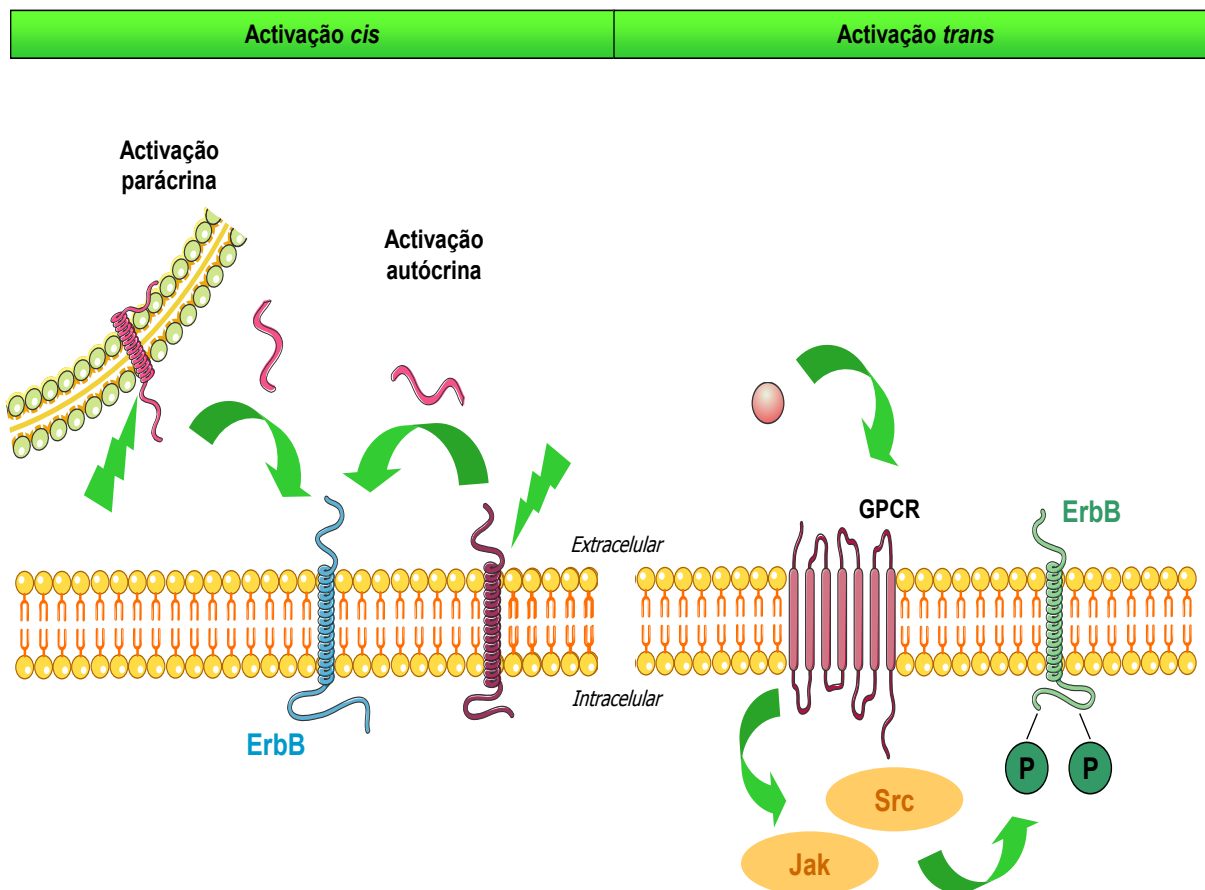


Fig. 3 – Mecanismos de activação dos receptores ErbB: activação cis e activação trans. Legenda: GPCR – receptores ligados a proteína G; F – receptor fosforilado (adaptado de¹⁶).

a sobre-expressão¹ ou a disfunção do gene correspondente está implicada na etiologia de diversos cancros humanos (mama, pulmão, cérebro e ovário)¹⁴.

Os receptores ErbB têm uma estrutura característica que inclui dois domínios ricos em cisteína no seu domínio extracelular, um domínio transmembranar e uma proteína com actividade do tipo cinase da tirosina, intrínseca ao seu domínio intracelular. Esta última catalisa a fosforilação de resíduos de tirosina em sequências polipeptídicas, que resultam na activação de cascatas de transdução de sinal. Por sua vez, o domínio catalítico com actividade de cinase é activado quando o receptor se associa ao respectivo ligando, sofrendo alteração conformacional e dimerização¹⁵.

1 A amplificação refere-se a um aumento do número de cópias do gene, enquanto a sobre-expressão se relaciona com um excesso de produção da proteína. Ambos os processos conferem às células cancerígenas afectadas um comportamento caracteristicamente agressivo.

Dois conjuntos distintos de ligandos reconhecem e controlam os receptores ErbB1 e ErbB4; o receptor ErbB2 aparentemente parece ter perdido o seu ligando e a actividade da sua cinase da tirosina não é regulada; o receptor ErbB3 tem apenas dois ligandos, mas a sua função catalítica sofreu a acumulação de substituições responsáveis pela inactivação de resíduos essenciais¹⁶ (ver Figura 2).

Os efeitos biológicos da NRG1 no coração são mediados pelos receptores ErbB2, ErbB3 e ErbB4. A ligação da NRG1 ao seu receptor, induzindo a formação de homo- e heterodímeros, é um passo crucial nesta via de sinalização¹⁷. Embora o receptor ErbB2 não seja capaz de se ligar directamente à NRG1, a sua importância biológica resulta do facto de ser o parceiro de eleição do receptor ErbB3 e ErbB4 para heterodimerização^{15,16}. O receptor ErbB1 não se liga

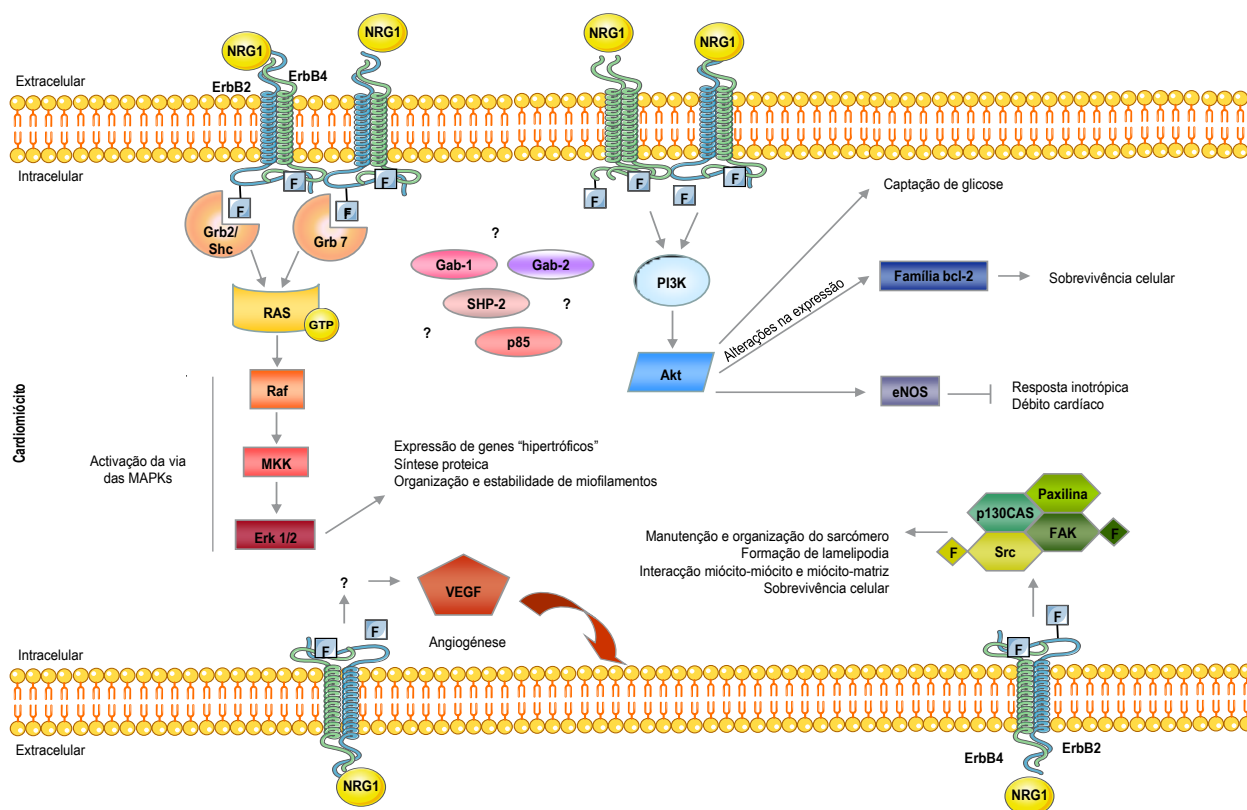


Fig. 4 – Vias de sinalização intracelular do sistema NRG1/ErbB2/4 no coração adulto (para detalhes ver texto e Quadro 1).

Quadro 1– Receptores e mecanismos implicados nas principais vias de sinalização da sistema NRG1/ErbB2/4 no coração adulto.

Vias de Sinalização	Receptores implicados	Mecanismo
MEK/Erk 1/2	ErbB2 parece ser suficiente para a activação desta via ^{44,69} .	Os membros da família Grb, nomeadamente Grb2/Shc e Grb7 são capazes de se ligar ao receptor ErbB2 e são conhecidos por se associarem a RAS/Mek/Erk 1/2 ⁷⁰⁻⁷³ .
PI3 - cinase/Akt	ErbB4, mas não ErbB2 poderá ser requerido desde que a concentração de NRG1 disponível seja suficiente para activar homodímeros ErbB4/ErbB4 ² .	Alterações na expressão da família bcl-2 ^{74,75} ; aumento da captação de glicose ¹ ; activação de eNOS ⁴¹ ; alterações da respiração mitocondrial ² .
Família Gab (<i>Grb-2-associated binder</i>): Gab1 e Gab2, mas não Gab3	—	Os agonistas dos receptores ErbB, incluindo NRG1β, HB-EGF e EGF, induzem uma forte fosforilação da tirosina de Gab1 e de Gab2 e estes associam-se a SHP2 e a p85 ⁷⁶ ; aumento da expressão de angiopoietina 1 em resposta à NRG1 em ratinhos controle (não condicionados para Gab1 e Gab2) ⁷⁶ .
FAK (<i>Focal Adhesion Kinase</i>)	O pré-tratamento com um anticorpo anti-ErbB2 bloqueia a fosforilação de FAK induzida pela NRG1 e a formação de complexos de adesão focal ⁴⁸ .	Indução da fosforilação de Src ⁷⁷⁻⁷⁸ , e de FAK, independente das vias PI3-kinase/Akt e Erk; estimulação da formação de um complexo multiproteico entre ErbB2, FAK, p130 ^{Cas} e paxilina e indução de lamelipódia com alongamento longitudinal e associação dos cardiomiócitos; regulação da formação de Fac e dispersão direccional dos miócitos ⁴⁸ .
?	ErbB2 ⁷⁹⁻⁸⁰ .	Indução e libertação de VEGF (estudos baseados no efeito do trastuzumab em células tumorais que expressam ErbB2) ⁷⁹⁻⁸⁰ .
Produção de NO via eNOS	—	Redução da resposta miocárdica inotrópica à estimulação adrenérgica, mimetizando efeito do receptor colinérgico muscarínico ² .

à NRG1 e, como tal, não participa na sinalização da NRG1/ErbB ¹⁸.

Conhecem-se alguns mecanismos de activação dos receptores ErbB, nomeadamente activação *cis* e activação *trans*, sendo que a primeira leva à auto-

fosforilação do receptor, enquanto a segunda promove sinais intracelulares independentes do ligando e da actividade catalítica de ErbB ¹⁶ (ver Figura 3).

A activação *cis* por estimulação parácrina ocorre pela produção de factores de crescimento,

por determinadas células vizinhas, que estimulam as células que expressam ErbB. A activação *cis* por estimulação autócrina, menos prevalente, consiste na produção própria de ligandos semelhantes ao EGF. Esta produção é controlada por receptores associados a proteínas G (GPCR – *G-Protein Coupled Receptors*) e pelos seus ligandos (como a trombina, a bombesina, a endotelina-1 e o ácido lisofosfatídico) que estimulam metaloproteínases membranares, como a ADAM-10. Os ligandos são sintetizados como precursores transmembranares e processados na superfície da célula de forma a libertar moléculas de factores de crescimento. A activação *trans* corresponde à estimulação de cinases da tirosina citoplasmáticas, como Jak e Src, mediante a estimulação de uma variedade de ligandos que actuam nos seus respectivos receptores. A hormona de crescimento que estimula a Jak¹⁶ e agonistas de GPCR, como o ácido lisofosfatídico, o carbacol e a trombina, que activam a Src, são exemplos de activação *trans*².

Vias de sinalização intracelulares

Os dados provenientes de estudos *in vitro* são um contributo essencial para o estudo de possíveis mecanismos de sinalização e de respostas celulares à NRG1, bem como dos receptores envolvidos, já que as células do coração intacto podem ser separadas e mantidas em cultura por dias a semanas, sendo este um sistema relativamente puro de populações celulares². As vias de sinalização cardíaca do sistema NRG1/ErbB identificadas até ao momento incluem: MEK/Erk 1/2^{19,20}, PI3-cinase/Akt^{19,20}, Src/FAK, factor de crescimento endotelial vascular (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*) e sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS – *Endothelial Nitric Oxide Synthase*). Os processos biológicos regulados por estas vias, bem como os subtipos de receptores ErbB e as moléculas envolvidos na sinalização apresentam-se no Quadro 1 e na Figura 4.

EFEITOS CARDIOVASCULARES NO ADULTO

No coração adulto, estudos imuno-histoquímicos realizados em aortas e corações de ratos adultos demonstraram que a expressão de ambas as isoformas de NRG1, NRG1 β e NRG1 α , está restrita ao endotélio endocárdico e endotélio microvascular cardíaco, estando ausente no endotélio aórtico e nas veias e artérias coronárias de maior calibre²¹. Embora o receptor ErbB3 seja expresso nos miócitos neonatais, os cardiomiócitos adultos ventriculares expressam apenas os receptores ErbB1, ErbB2 e ErbB4²². Os receptores ErbB2 e ErbB4 estão localizados no sistema dos túbulos T e discos intercalares, em proximidade com os componentes do sistema de acoplamento excitação-contracção²³. Também há evidências de que

os receptores da NRG1 sejam expressos nas células musculares lisas^{24,25}. Adicionalmente, o estudo do efeito da estimulação dos receptores ErbB ao nível das células endoteliais da veia umbilical humana demonstrou que um subconjunto de receptores ErbB, nomeadamente ErbB2, ErbB3 e ErbB4, são expressos a este nível²⁶.

Efeitos vasculares

Inúmeros estudos têm revelado que a NRG1 estimula a angiogénese e que os receptores ErbB são essenciais para o recrutamento das células musculares lisas vasculares (VSMCs – *Vascular Smooth Muscle Cell*) regulado pela angiopoietina e efectuado por células endoteliais durante este processo^{26,28}. Assim, os receptores ErbB endoteliais podem estar envolvidos na sobrevivência e crescimento das células endoteliais mediado pela NRG1 e, desta forma, estarem implicados na angiogénese²⁶.

Tem sido demonstrado que a expressão de NRG1 está aumentada em lesões ateroscleróticas humanas, podendo desempenhar um papel importante na placa aterosclerótica²⁹.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crónica, que afecta a parede dos vasos arteriais e envolve múltiplos processos, incluindo disfunção endotelial, inflamação, proliferação de VSMCs e alteração da matriz. Esta doença complexa induz a libertação de citocinas pró-inflamatórias e factores de crescimento que estimulam as VSMCs, normalmente quiescentes, a migrar e proliferar da camada média dos vasos em direcção à íntima, resultando numa hiperplasia da neoíntima^{30,31}.

O desenvolvimento da aterosclerose é promovido pela acumulação de ésteres de colesterol nos macrófagos, processo pela qual a aciltransferase colesterol-coenzima A (ACAT1 – *acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase 1*) é responsável, contribuindo assim para a formação de células espumosas, um evento fundamental nas fases iniciais desta doença^{32,33}. Em contraposição, o efluxo de colesterol mediado pelo ABCA1 (*ATP Binding Cassette Transporter A1*) via apolipoproteína A-1 desempenha um papel chave na prevenção da aterosclerose³⁴.

A NRG1 atenua significativamente a formação de lesão após um dano vascular e previne a migração e proliferação das VSMCs estimuladas por mitogénios, o que sugere que a NRG1 tem um efeito inibidor na formação de neoíntima após lesão vascular e, como tal, poderá ser útil na prevenção e no tratamento de doenças vasculares, tais como, a restenose e a aterosclerose. Supõe-se que a sobre-regulação de NRG1 possa ser um mecanismo de resposta protectora imediata para inibir a proliferação local das VSMCs. Adicionalmente aos efeitos directos sobre as células musculares lisas, também é possível que a NRG1 subregule as respostas

pró-inflamatórias que exacerbam os processos envolvidos na formação de neointima. Esta molécula pode ainda evitar a produção de matriz extracelular necessária para facilitar a expansão da lesão da neointima³⁵.

Xu et al³² demonstraram recentemente que a NRG1 tem efeitos ateroprotectores através da supressão da formação de macrófagos espumosos. Os mecanismos moleculares subjacentes envolvem uma subregulação do SR-A (*Scavenger Receptor class A*) e da ACAT1, responsáveis pela endocitose reduzida de lipoproteínas de baixa-densidade acetiladas (AcLDL – *Acetylated Low-Density Lipoprotein*) e pela formação reduzida de ésteres de colesterol, respectivamente, e uma sobrerregulação de ABCA1 nos macrófagos, responsável pelo aumento do efluxo de colesterol mediado pela ApoA-1. Os mesmos autores evidenciaram que os níveis de NRG1 estão diminuídos nas placas coronárias avançadas na síndrome coronária aguda, embora ainda seja desconhecido se os níveis diminuídos da NRG1 β podem contribuir para, ou ser resultado de, eventos coronários nesta síndrome. Desta forma, os mesmos especulam que a expressão reduzida da NRG1 β nos macrófagos das placas ateroscleróticas avançadas pode ser o resultado da sobrerregulação de ADAM-17, necessária para a clivagem de NRG1 β ³⁶. Desta forma, a NRG1 poderá ser usada como um biomarcador na doença arterial coronária e como uma janela terapêutica alargada para o combate de aterosclerose e restenose após angioplastia coronária.

Durante uma lesão vascular ocorre uma sobrerregulação de moléculas mitogénicas que promovem a sua progressão. Algumas dessas moléculas são ligandos adicionais dos receptores ErbB, tais como o EGF de ligação à heparina e a betacelulina^{30,37}, pelo que a administração exógena de NRG1 pode alterar o equilíbrio em direcção a um estado antiaterosclerótico. Também tem sido demonstrado que um outro mitogénio, o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor*), contribui significativamente para a formação de neointima^{30,38} por estimulação da proliferação e da migração de células musculares lisas, através da activação da via Erk1/2^{39,40}. A fosforilação desta via estimulada pelo PDGF é suprimida pela NRG1 e, deste modo, supõe-se que a NRG1 bloqueie os mecanismos de sinalização das vias proliferativas iniciadas pelos receptores do PDGF envolvendo Erk1/2³⁵.

Efeitos miocárdicos

A NRG1 também modula a contractilidade miocárdica. Ambas as isoformas de NRG1, α e β , induzem uma resposta inotrópica negativa em músculos papilares de coelho adulto⁴¹, estando este

efeito preservado durante a estimulação adrenérgica. À primeira vista, este efeito inotrópico negativo pode colidir com as supostas acções protectoras da NRG1 no coração, no entanto, não deve ser vista como prejudicial⁴². O efeito inotrópico negativo pode ser benéfico porque diminui o consumo miocárdico de oxigénio durante situações de stresse e também permite explicar porque é que ocorre subregulação dos receptores ErbB2 e ErbB4 no miocárdio no início da insuficiência cardíaca (IC)⁴³, podendo esta ser uma tentativa de melhorar a função contráctil.

Relativamente às vias envolvidas na modulação deste efeito, verificou-se que a inibição de NOS atenua os efeitos da NRG1 na contractilidade miocárdica, enquanto a inibição da via das prostaglandinas não tem efeito⁴¹. Em cardiomiócitos em cultura, a NRG1 aumenta a libertação de nitrito, sugerindo que o efeito inotrópico negativo é mediado, pelo menos em parte, pelo óxido nítrico (NO). Adicionalmente, a NRG1 activa a Akt em cardiomiócitos em cultura⁴⁴, uma cinase de serina/treonina envolvida na fosforilação da eNOS⁴⁵, sendo a sua activação consistente com o efeito inotrópico negativo documentado. Deve, no entanto, salientar-se que existem resultados contraditórios relativamente ao papel do NO sobre o inotropismo⁴², provavelmente relacionados com a compartimentalização subcelular das isoformas da NOS. A eNOS localizada nas cavéolas dos túbulos-T próximas ao retículo sarcoplasmático pode aumentar o acoplamento excitação-contracção em resposta ao estiramento, o que surge em contradição com a documentada depressão da contractilidade e da resposta β -adrenérgica nas cavéolas que contêm receptores β -adrenérgicos⁴⁶. A evidência da co-localização dos receptores ErbB juntamente com a eNOS e os receptores β -adrenérgicos a nível caveolar⁴⁷ corrobora o efeito inotrópico negativo observado.

Efeitos na sobrevivência, crescimento celular e organização dos cardiomiócitos

Estudos experimentais têm demonstrado vários efeitos *in vitro* da NRG1 recombinante nos cardiomiócitos pós-natais e adultos, incluindo a regulação da sobrevivência^{20,22}, o crescimento hipertrófico, a proliferação^{19,22}, a organização miofibrilar⁴⁴, e o contacto célula-célula entre cardiomiócitos⁴⁸.

A activação dos receptores ErbB2 e ErbB4 pela NRG1 β recombinante resulta no crescimento dos miócitos e na inibição da apoptose *in vitro*²². A NRG1 libertada pelas células endoteliais protege os cardiomiócitos em cultura de morte celular apoptótica induzida por stresse oxidativo e antraciclina^{49,21}, sendo a via da cinase PI-3/Akt crítica para este processo²².

Os estudos efectuados indicam que a NRG1 não é essencial para a divisão celular e para a sobrevivência em condições fisiológicas normais. Porém, em certas situações tais como infecções víricas, deficiência nutricional e tratamento com agentes citotóxicos, a activação da sinalização da NRG1/ErbB pode proteger as células miocárdicas da apoptose⁵⁰.

Embora inicialmente se tenha postulado que estes efeitos protectores celulares eram modulados pela sinalização decorrente da activação do receptor ErbB4^{20,49}, foi demonstrado recentemente que estes efeitos são também mediados pelo receptor ErbB2²¹, pelo menos *in vitro*. Lemmens et al²¹, ao usarem anticorpos monoclonais inibidores da fosforilação do receptor ErbB2 e da sinalização subsequente, evidenciaram que a sobrevivência e o crescimento dos cardiomiócitos induzidos pelo endotélio foram suprimidos. Estes resultados constituem uma prova directa do papel do receptor ErbB2 na interacção entre os cardiomiócitos e o endotélio e na preservação da integridade miocárdica, sugerindo que os anticorpos anti-ErbB2 utilizados na clínica podem realmente interferir com as vias de sobrevivência dos cardiomiócitos.

As NRGs fazem parte de uma lista de estímulos, incluindo também os agentes α -adrenérgicos, o estiramento mecânico, a hormona tiroideia, a interleucina-1 β , os factores de crescimento fibroblástico, o factor de crescimento semelhante ao factor de crescimento de ligação à heparina, as endotelinas e as angiotensinas, entre outros, que induzem o crescimento hipertrofico dos cardiomiócitos²². Contudo, não há ainda evidência para o efeito da NRG1 na promoção da hipertrofia dos cardiomiócitos *in vivo*⁵¹.

Kuramochi et al⁴⁸ realçaram o papel do sistema NRG1 β /ErbB2 na organização e manutenção da estrutura sarcomérica e na interacção célula a célula e célula-matriz dos cardiomiócitos, através da regulação da activação da cínase de adesão focal (FAK – *Focal Adhesion Kinase*), da formação de complexos de adesão focal (FAC – *Focal Adhesion Complexes*) e de *spreading* direccionado dos miócitos. O mesmo estudo evidenciou que a activação desta via de sinalização pela NRG1 β induz o acoplamento dos cardiomiócitos através da formação de lamelipodia, processo que *in vitro* ocorreu em poucos dias. Além disso, tem sido sugerido que a via de sinalização NRG1 β /ErbB2 desempenha um papel na manutenção da estrutura do sarcómero pela indução de interacção entre a FAK e p130^{Cas}, dado que ratos com deficiência em p130^{Cas} morrem *in utero* com falha no desenvolvimento cardíaco⁵² e a sobre-expressão de p130^{Cas} ou do domínio alvo de adesão focal C-terminal da FAK nos cardiomiócitos neonatais rompem a estrutura do sarcómero^{53,54}.

Considerando os seus locais de expressão a nível cardíaco, a NRG1 pode actuar na interacção entre os miócitos e o endotélio, que regula a função e remodelagem no período pós-natal, particularmente após lesão miocárdica²⁰. A expressão persistente dos receptores da NRG no coração adulto e os efeitos da mesma sobre o fenótipo dos miócitos adultos sugerem que a sinalização da NRG pode estar envolvida na adaptação cardíaca ao stresse fisiológico (i.e. remodelagem ventricular)²².

Interacção com outros mediadores neuro-humorais

Para além dos vários efeitos descritos, existem evidências que sugerem que a NRG1 é um modulador fisiológico do equilíbrio simpático-vagal.

Estudos fisiológicos clássicos demonstraram que a estimulação dos receptores muscarínicos pelo carbachol resulta em pouco ou nenhum efeito inotrópico negativo directo sobre o miocárdio ventricular⁵⁵, embora induza a redução da contractilidade no miocárdio estimulado por agonistas β -adrenérgicos^{55,56}. Assim, no coração normal, a activação dos receptores muscarínicos parassimpáticos desempenha um papel cardioprotector, contrabalançando o excesso de activação β -adrenérgica e, pelo contrário, o excesso de activação β -adrenérgica associada à actividade parassimpática diminuída é prejudicial durante a ocorrência de IC. O efeito anti- β -adrenérgico da estimulação parassimpática é mediado pela ligação do receptor muscarínico M2 à subunidade $G\alpha_i$ e $G\alpha_o$ da proteína G⁵⁷. A ligação à subunidade $G\alpha_o$ resulta na inibição dos canais de cálcio do tipo L⁵⁸, enquanto a proteína $G\alpha_i$ causa a inibição da adenilciclase e, conseqüentemente, diminuição do cAMP intracelular, que resulta numa diminuição da corrente de cálcio do tipo L^{59,60}. Foi sugerido que a atenuação da via de sinalização β -adrenérgica por agonistas dos receptores muscarínicos requer a activação da eNOS, a activação de cGMP pelo NO, a estimulação da fosfodiesterase do tipo II e, subsequentemente, a diminuição do cAMP⁵⁶. De facto, a sobre-expressão da eNOS atenua a estimulação β -adrenérgica, reforçando a resposta muscarínica⁶¹. Todavia, outros estudos não encontraram alterações na resposta à estimulação muscarínica em ratos deficientes em eNOS^{62,63}.

A NRG1 é responsável pela diminuição da resposta miocárdica inotrópica à estimulação adrenérgica. De facto, foi demonstrado que a administração exógena de NRG1 atenua a resposta β -adrenérgica em músculos papilares isolados do ventrículo direito de Coelho na ausência de activação muscarínica exógena⁴¹. Este efeito foi evidenciado, mediante o desvio para a direita da curva concentração-resposta da isoprenalina em cerca de uma unidade logarítmica⁴¹, de forma

semelhante aos efeitos anti-adrenérgicos da sinalização dos receptores colinérgicos muscarínicos. Deste modo, a via de sinalização da NRG1/ErbB pode ter um papel modulador e ser activada em condições de inotropismo cardíaco aumentado, tais como a hipertrofia miocárdica ou durante a estimulação β -adrenérgica⁴¹.

Os efeitos da sinalização NRG1/ErbB anti-adrenérgica e os efeitos da sinalização muscarínica anti-adrenérgica funcionam, assim, em mútua cooperação. A sinalização NRG1/ErbB anti-adrenérgica desaparece quando o receptor colinérgico muscarínico está bloqueado⁶⁴ e a sinalização colinérgica muscarínica está diminuída quando a NRG1 está ausente⁶⁵. A NRG1 e o sistema parassimpático podem necessitar da eNOS para exercer os efeitos anti-adrenérgicos, demonstrando uma possível ligação molecular entre estas duas vias.

Num contexto mais amplo, é tentador especular que através da interacção com o sistema colinérgico, a NRG1 diminui o débito cardíaco e, consequentemente a pressão sanguínea. Em resposta à libertação de angiotensina II e adrenalina na circulação sanguínea, por diminuição da pressão sanguínea arterial, o endotélio cardíaco adapta a síntese de NRG1 e, assim, modula o efeito anti-adrenérgico de acordo com as necessidades periféricas, aumentando o débito cardíaco e a resistência vascular periférica²¹. As acções supressoras de ambos os sistemas neuro-humorais na via de sinalização da NRG1 endotelial combinam com estas acções de aumento da pressão sanguínea e reduzem a actividade anti-adrenérgica da NRG1 no coração^{41, 65}.

Estudos realizados por Chung e Walker⁶⁶ demonstraram a existência de interacção entre o sistema de sinalização do receptor do tipo A da endotelina-1 (ET_A), e as moléculas envolvidas na transdução de sinal da via de sinalização da NRG e dos seus receptores ErbB2/4 (PI-3, Akt, Raf-1, MEK, Erk). Além disso, os receptores ET_A⁶⁷ e ErbB2/4, assim como as suas moléculas de transdução de sinal, localizam-se nos túbulos T cardíacos, localização favorável para a ocorrência das referidas interacções.

Os receptores do tipo tirosina cinase e GPCR estão co-localizados nos cardiomiócitos adultos e ocorre interacção entre eles. No entanto, recentemente tem-se evidenciado que a interacção entre as vias resultantes da activação dos receptores ET_A e ErbB é fundamentalmente diferente nos cardiomiócitos neonatais e adultos. Foi proposto que a transactivação é exclusiva dos cardiomiócitos neonatais e que a ausência de compartimentos dos túbulos T nos mesmos pode explicar satisfatoriamente a diferente interacção⁶⁶. Por outro lado, nos miócitos ventriculares adultos, demonstrou-se uma profunda inibição da sinalização

de erbB2/4 pela ET-1. A ET-1 estimula a fosforilação de Erk 1/2 e atenua substancialmente muitas das acções mediadas pela NRG1 β , incluindo a fosforilação de ErbB2/4, fosforilação de Akt e o efeito inotrópico negativo. A inibição do efeito inotrópico negativo da NRG1 β sugere um papel na potenciação do efeito contráctil positivo da ET-1 no coração. Neste contexto, admite-se que os receptores ET_A não promovem o crescimento do coração adulto pela transactivação de ErbB2/4, mas provavelmente pela via de sinalização Raf-1/MEK/Erk1/2⁶⁶.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento de disfunção ventricular associada ao uso de anticorpos contra o receptor ErbB2 em pacientes com cancro da mama evidenciou pela primeira vez a importância da via de sinalização NRG1/ErbB e o papel cardioprotector da NRG1 no coração adulto. Os estudos subsequentes realizados em condições *in vitro* e *in vivo*, nomeadamente em ratinhos transgénicos e mais recentemente em humanos, têm permitido clarificar os efeitos e as respectivas vias de sinalização associados ao sistema NRG1/ErbB no coração adulto. Para além de ser fundamental durante o desenvolvimento cardíaco, o sistema NRG1/ErbB tem demonstrado o seu papel na promoção do crescimento da sobrevivência miocárdica, no desempenho miocárdico, no balanço simpático-vagal e nas alterações de fenótipo induzidas por sobrecarga no coração adulto. A compreensão plena deste sistema possibilitará o planeamento de estratégias de prevenção e de combate da disfunção cardíaca em pacientes que recebem trastuzumab e antraciclina, bem como a produção de fármacos que dissociem os efeitos benéficos dos efeitos adversos deste tipo de tratamento. No entanto, para além da possibilidade de ultrapassar os efeitos colaterais de uma terapêutica, o esclarecimento desta via molecular apresenta-se como uma nova oportunidade diagnóstica e terapêutica para as doenças cardiovasculares.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projecto “nº FCOMP-01-0124-FEDER-011051 (Ref. FCT PTDC/SAU-FCF/100442/2008)” e pelos Projectos Pluridisciplinares para Estímulo à Iniciação à Investigação na Universidade do Porto/Santander totta, Edições 2009 e 2010. C.B-S é investigadora ao abrigo Programa Ciência 2008.

REFERÊNCIAS

1. COTE GM, MILLER TA, LEBRASSEUR NK, KURAMOCHI YSAWYER DB: Neuregulin-1alpha and beta isoform expression in cardiac microvascular endothelial cells and function in cardiac myocytes in vitro. *Exp Cell Res* 2005;311:135-146
2. PENTASSUGLIA L, SAWYER DB: The role of Neuregulin-1beta/ErbB signaling in the heart. *Exp Cell Res* 2009;315:627-37
3. SEIDMAN A, HUDIS C, PIERRI MK et al: Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 2002;20:1215-21
4. CRONE SA, ZHAO YY, FAN L et al: ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2002;8:459-465
5. OZCELIK C, ERDMANN B, PILZ B et al: Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8880-5
6. LIU FF, STONE JR, SCHULDT AJ et al: Heterozygous knockout of neuregulin-1 gene in mice exacerbates doxorubicin-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H660-6
7. MARCHIONNI MA, GOODEARL AD, CHEN MS et al: Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* 1993;362:312-8
8. JONES JT, AKITA RWSLIWKOWSKI MX: Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 1999;447:227-231
9. FALLS DL: Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 2003;284:14-30
10. SHIRAKABE K, WAKATSUKI S, KURISAKI TFUJISAWA-SEHARA A: Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J Biol Chem* 2001;276:9352-8
11. MONTERO JC, YUSTE L, DIAZ-RODRIGUEZ E, ESPARIS-OGANDO APANDIELLA A: Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Mol Cell Neurosci* 2000;16:631-648
12. WANG JY, MILLER SJFALLS DL: The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain. *J Biol Chem* 2001;276:2841-51
13. LIU X, HWANG H, CAO L et al: Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13024-9
14. AGUS DB, BUNN PA, JR., FRANKLIN W, GARCIA MOZOLS RF: HER-2/neu as a therapeutic target in non-small cell lung cancer, prostate cancer, and ovarian cancer. *Semin Oncol* 2000;27:53-63; discussion 92-100
15. LEMKE G: Neuregulins in development. *Mol Cell Neurosci* 1996;7:247-262
16. MOSESSON YYARDEN Y: Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. *Semin Cancer Biol* 2004;14:262-270
17. HOLBRO THYNES NE: ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:195-217
18. BRITSCH S: The neuregulin-1/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2007;190:1-65
19. BALIGA RR, PIMENTAL DR, ZHAO YY et al: NRG-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. Role of PI-3-kinase, p70(S6K), and MEK-MAPK-RSK. *Am J Physiol* 1999;277:H2026-237
20. FUKAZAWA R, MILLER TA, KURAMOCHI Y et al: Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1473-9
21. LEMMENS K, SEGERS VF, DEMOLDER MDE KEULENAER GW: Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk. *J Biol Chem* 2006;281:19469-77
22. ZHAO YY, SAWYER DR, BALIGA RR et al: Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 1998;273:10261-9
23. GARRATT AN: "To erb-B or not to erb-B..." Neuregulin-1/ErbB signaling in heart development and function. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:215-8
24. KRYMSKAYA VP, HOFFMAN R, ESZTERHAS A et al: EGF activates ErbB-2 and stimulates phosphatidylinositol 3-kinase in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1999;276:L246-255
25. IIVANAINEN E, NELIMARKKA L, ELENIOUS V et al: Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor. *Faseb J* 2003;17:1609-21
26. RUSSELL KS, STERN DF, POLVERINI PJBENDER JR: Neuregulin activation of ErbB receptors in vascular endothelium leads to angiogenesis. *Am J Physiol* 1999;277:H2205-11
27. BAGHERI-YARMAND R, VADLAMUDI RK, WANG RA, MENDELSON JKUMAR R: Vascular endothelial growth factor up-regulation via p21-activated kinase-1 signaling regulates heregulin-beta1-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:39451-7
28. YEN L, YOU XL, AL MOUSTAFAAE et al: Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* 2000;19:3460-9
29. PANUTSOPULOS D, ARVANITIS DL, TSATSANIS C et al: Expression of heregulin in human coronary atherosclerotic lesions. *J Vasc Res* 2005;42:463-474
30. HIROTA H, CHEN J, BETZ UA et al: Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999;97:189-198
31. RAINES EWROSS R: Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993;69:S30-7
32. XU G, WATANABE T, ISO Y et al: Preventive effects of heregulin-beta1 on macrophage foam cell formation and atherosclerosis. *Circ Res* 2009;105:500-510
33. MIYAZAKI A, SAKASHITA N, LEE O et al: Expression of ACAT-1 protein in human atherosclerotic lesions and cultured human monocytes-macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1568-74
34. ORAM JFVAUGHAN AM: ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res* 2006;99:1031-43
35. CLEMENT CM, THOMAS LK, MOU Y et al: Neuregulin-1 attenuates neointimal formation following vascular injury and inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 2007;44:303-312
36. OKSALA N, LEVULA M, AIRLA N et al: ADAM-9, ADAM-15, and ADAM-17 are upregulated in macrophages in advanced human atherosclerotic plaques in aorta and carotid and femoral arteries--Tampere vascular study. *Ann Med* 2009;41:279-290
37. SHIN HS, LEE HJ, NISHIDA M et al: Betacellulin and amphiregulin induce upregulation of cyclin D1 and DNA synthesis activity through differential signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2003;93:302-310
38. RAINES EW: PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:237-254
39. ZHAN Y, KIM S, IZUMI Y et al: Role of JNK, p38, and ERK in platelet-derived growth factor-induced vascular proliferation, migration, and gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:795-801
40. GRAF K, XI XP, YANG D et al: Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997;29:334-9

41. LEMMENS K, FRANSEN P, SYS SU, BRUTSAERT DLDE KEULENAER GW: Neuregulin-1 induces a negative inotropic effect in cardiac muscle: role of nitric oxide synthase. *Circulation* 2004;109:324-6
42. BRUTSAERT DL: Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev* 2003;83:59-115
43. ROHRBACH S, YAN X, WEINBERG EO, et al.: Neuregulin in cardiac hypertrophy in rats with aortic stenosis. Differential expression of erbB2 and erbB4 receptors. *Circulation* 1999;100:407-412
44. SAWYER DB, ZUPPINGER C, MILLER TA, EPPENBERGER HMSUTER TM: Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1beta and anti-erbB2: potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2002;105:1551-4
45. FLEMING IBUSSE R: Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R1-12
46. MASSION PB, FERON O, DESSY CBALLIGAND JL: Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 2003;93:388-398
47. FERON O, ZHAO YYKELLY RA: The ins and outs of caveolar signaling. m2 muscarinic cholinergic receptors and eNOS activation versus neuregulin and ErbB4 signaling in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1999;874:11-9
48. KURAMOCHI Y, GUO XSAWYER DB: Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:228-235
49. KURAMOCHI Y, COTE GM, GUO X et al: Cardiac endothelial cells regulate reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis through neuregulin-1beta/erbB4 signaling. *J Biol Chem* 2004;279:51141-7
50. XU Y, LI XZHOU M: Neuregulin-1/ErbB signaling: a druggable target for treating heart failure. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:214-9
51. LIU X, GU X, LI Z et al: Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1438-47
52. HONDA H, ODA H, NAKAMOTO T et al: Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas. *Nat Genet* 1998;19:361-5
53. KOVACIC-MILIVOJEVIC B, ROEDIGER F, ALMEIDA EA et al: Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *Mol Biol Cell* 2001;12:2290-307
54. KOVACIC-MILIVOJEVIC B, DAMSKY CC, GARDNER DGILIC D: Requirements for the localization of p130 Cas to Z-lines in cardiac myocytes. *Cell Mol Biol Lett* 2002;7:323-9
55. ENDOH M: Muscarinic regulation of Ca2+ signaling in mammalian atrial and ventricular myocardium. *Eur J Pharmacol* 1999;375:177-196
56. HAN X, KUBOTA I, FERON O et al.: Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte ICa-L is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6510-5
57. ENDOH M, MARUYAMA MIJIMA T: Attenuation of muscarinic cholinergic inhibition by islet-activating protein in the heart. *Am J Physiol* 1985;249:H309-320
58. VALENZUELA D, HAN X, MENDE U et al: G alpha(o) is necessary for muscarinic regulation of Ca2+ channels in mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1727-32
59. HOSEY MM: Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J* 1992;6:845-852
60. BRODDE OE, BRUCK H, LEINEWEBER KSEYFARTH T: Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol* 2001;96:528-538
61. MASSION PB, DESSY C, DESJARDINS F et al: Cardiomyocyte-restricted overexpression of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) attenuates beta-adrenergic stimulation and reinforces vagal inhibition of cardiac contraction. *Circulation* 2004;110:2666-72
62. VANDECASTEELE G, ESCHENHAGEN T, SCHOLZ H et al: Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 1999;5:331-4
63. BELEVYCH AEHARVEY RD: Muscarinic inhibitory and stimulatory regulation of the L-type Ca2+ current is not altered in cardiac ventricular myocytes from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *J Physiol* 2000;528 Pt 2:279-289
64. OKOSHI K, NAKAYAMA M, YAN X et al: Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation* 2004;110:713-7
65. LEMMENS K, SEGERS VFDE KEULENAER GW: Letter regarding article by Okoshi et al, "neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: muscarinic modulation of {beta}-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion". *Circulation* 2005;111:e175; author reply e175
66. CHUNG KYWALKER JW: Interaction and inhibitory cross-talk between endothelin and ErbB receptors in the adult heart. *Mol Pharmacol* 2007;71:1494-502
67. ROBU VG, PFEIFFER ES, ROBIA SL et al: Localization of functional endothelin receptor signaling complexes in cardiac transverse tubules. *J Biol Chem* 2003;278:48154-61
68. LEMMENS K, DOGGEN KDE KEULENAER GW: Role of neuregulin-1/ErbB signaling in cardiovascular physiology and disease: implications for therapy of heart failure. *Circulation* 2007;116:954-60
69. PENTASSUGLIA L, TIMOLATI F, SEIFRIZ F et al: Inhibition of ErbB2/neuregulin signaling augments paclitaxel-induced cardiotoxicity in adult ventricular myocytes. *Exp Cell Res* 2007;313:1588-601
70. ZHANG S, WEINHEIMER C, COURTOIS M, et al.: The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Clin Invest* 2003;111:833-841
71. DALY JM, JANNOT CB, BEERLI RR et al: Neu differentiation factor induces ErbB2 down-regulation and apoptosis of ErbB2-overexpressing breast tumor cells. *Cancer Res* 1997;57:3804-11
72. PERO SC, SHUKLA GS, COOKSON MM, FLEMER S, JR.KRAG DN: Combination treatment with Grb7 peptide and Doxorubicin or Trastuzumab (Herceptin) results in cooperative cell growth inhibition in breast cancer cells. *Br J Cancer* 2007;96:1520-5
73. OBREZTCHIKOVA M, ELOUARDIGHI H, HO M et al: Distinct signaling functions for Shc isoforms in the heart. *J Biol Chem* 2006;281:20197-204
74. JAMNICKI-ABEGG M, WEIHRAUCH D, PAGEL PS et al: Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating Akt and enhancing Bcl-2 expression. *Anesthesiology* 2005;103:1006-14
75. DHANASEKARAN A, GRUENLOH SK, BUONACCORSI JN et al: Multiple antiapoptotic targets of the PI3K/Akt survival pathway are activated by epoxycosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia/anoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H724-35
76. NAKAOKA Y, NISHIDA K, NARIMATSU M et al: Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling. *J Clin Invest* 2007;117:1771-81
77. PU M, AKHAND AA, KATO M et al: Evidence of a novel redox-

linked activation mechanism for the Src kinase which is independent of tyrosine 527-mediated regulation. *Oncogene* 1996;13:2615-22

78. YANG Z, BAGHERI-YARMAND R, WANG RA et al: The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) suppresses c-Src and Pak1 pathways and invasiveness of human cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:658-667

79. IZUMI Y, XU L, DI TOMASO E, FUKUMURA DJAIN RK:

Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 2002;416:279-280

80. WEN XF, YANG G, MAO W et al: HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy. *Oncogene* 2006;25:6986-96